

二化螟体内乙酰胆碱酯酶的分布及纯化方法

彭 宇, 王荫长, 韩召军, 陈长琨, 李国清

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 研究了二化螟 *Chilo suppressalis* 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的体躯和亚细胞分布, 并用凝胶过滤层析和 2 种亲和层析方法从二化螟幼虫体内分离、纯化乙酰胆碱酯酶。结果表明: 二化螟幼虫乙酰胆碱酯酶的活性主要集中于头部和胸部, 而成虫胸部乙酰胆碱酯酶的活性最低, 显著低于头部和腹部。成虫体内 AChE 的活性明显高于幼虫。在亚细胞的分布上, 乙酰胆碱酯酶主要位于膜上 (86%), 近 46% 的活性存在微粒体中。在 3 种纯化乙酰胆碱酯酶的方法中, 以 3-羧基苯基-乙基二甲基铵作配体的亲和层析法纯化效果最佳, 乙酰胆碱酯酶的最高纯化倍数为 536.05 倍, 产率 30.46%。

关键词: 二化螟; 乙酰胆碱酯酶; 亲和层析; 分布; 纯化

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2002) 02-0209-06

Distribution and purification of acetylcholinesterase in *Chilo suppressalis*

PENG Yu, WANG Yin-Chang, HAN Zhao-Jun, CHEN Chang-Kun, LI Guo-Qing (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The distribution in body and subcellular distributions and purification of cetylcholinesterase (AChE) in insecticide-resistant population of *Chilo suppressalis* were investigated. AChE was purified from the larvae of the same population by gel filtration and 2 species of affinity chromatography on 3-carboxyphenyl ethyldimethyl ammonium (CEA) and procainamide. The results showed that specific activity of AChE in adults was higher than that in larvae. AChE in larvae was distributed mostly in the head and the thorax; while in adults, AChE activity in thorax was lower than those in the head and the abdomen significantly. The major portion of the total AChE was member-bound (86%) and associated primarily with microsome (46%). Affinity chromatography on CEA was optimum for purification of AChE among 3 species purified methods. The extent of purification reached about 536.05 folds with recoveries of 30.46%.

Key words: *Chilo suppressalis*; acetylcholinesterase; affinity chromatography; distribution; purification

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) (EC 3.1.1.7) 是昆虫神经系统中最重要酶系之一, 同时又是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标 (Fournier and Mutero, 1994)。AChE 的敏感度降低是昆虫和螨类对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的重要机理之一 (Tang, 1993; Gunning *et al.*, 1998)。我们的研究表明, 二化螟 *Chilo suppressalis* 对甲胺磷的抗性也与 AChE 的敏感性下降有关 (彭宇等, 2001)。有关 AChE 的研究一直是昆虫毒理学研究的热点, 主要内容涉及 AChE 的毒理学、生物化学, AChE 的分离、纯化, AChE 的分子型、基因结构和表达, AChE 的变构与昆虫抗药性的关系等 (Zhu and Brindely, 1992; Zhu and Clark, 1994, 1995; 高希武, 1996, 1998)。本文报道了二

化螟体内 AChE 的分布, 并采用凝胶过滤层析和 2 种亲和层析方法, 从二化螟幼虫中分离、纯化 AChE, 以便更好地了解 AChE 在二化螟抗药性中的作用。

1 材料与方法

1.1 虫源

试验所用的二化螟为采自浙江温岭的抗性品系, 用稻苗饲养 (尚稚珍和王银淑, 1984)。

1.2 试剂

考马斯亮蓝 G₂₅₀、碘化硫代乙酰胆碱、毒扁豆碱均为 Fluka 公司产品。5, 5'-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB), 华美公司。溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B (CNBr-Sepharose 4B), 羟乙基活化的琼脂糖凝胶 4B

基金项目: 国家“九五”攻关项目 (19601) 和江苏省“九五”攻关项目 (BE96370)

第一作者简介: 彭宇, 男, 1967 年 9 月生, 博士, 教授, 研究方向为昆虫抗药性及害虫生物防治。现联系地址: 湖北大学生命科学学院, 武汉 210095, E-mail: yfengw@public.wh.hb.cn

收稿日期 Received: 2000-11-14; 接受日期 Accepted: 2001-04-26

(ECH-Sepharose 4B), Pharmacia 公司。1-环己基-3-(2-吗啉代乙基) 碳二亚胺甲基对甲苯磺酸盐、*N*-乙氧基羰基-2-乙氧基-1, 2-二氢喹啉 (*N*-ethoxycarbonyl-ethoxy-1, 2-dihydroquinolines, EEDQ)、硫酸普鲁卡因 (procainamide) 和二甲基氨基苯甲酸均为 Sigma 公司产品。碘乙烷, 四乙基碘化铵, 上海试剂一厂。1, 6-己二胺, 乙酸酐, 中国医药上海化学试剂公司。牛血清白蛋白, 上海生化试剂公司进口分装。葡聚糖凝胶 G-200 (Sephadex G-200), Triton X-100 以及其它试剂均购于江苏省科威公司。

1.3 AChE 在二化螟体躯的分布

分别取幼虫和成虫的头、胸部和腹部, 加入到预冷的 0.05 mol/L、pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液中, 冰浴匀浆。匀浆液在低温 (4℃), 10 000 × g 离心 30 min。取上清液测定 AChE 的活性, 并测定蛋白质含量。

1.4 二化螟幼虫 AChE 的亚细胞分布

取二化螟幼虫的头、胸部, 按 1 g:20 mL 的比例加入预冷的 0.05 mol/L、pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液, 冰浴匀浆。匀浆液按差速离心法离心 (高希武, 1996)。对于离心后的各组分, 加入含 Triton X-100 的磷酸钠盐缓冲液 (0.05 mol/L、pH 7.5) 悬浮, 使其浓度为 0.5%。在加入 Triton X-100 2 h 后, 测定各离心成分 AChE 的活性和蛋白质含量。

1.5 AChE 的纯化

凝胶过滤层析法: 取二化螟幼虫头、胸部, 按 1 g:10 mL 的比例加入含 Triton X-100 (浓度 0.5%)、pH 7.5、浓度为 0.05 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (PBS) 中, 冰浴匀浆。匀浆液在 4℃、10 000 × g 条件下离心 30 min。上清液作为粗酶液, 上 Sephadex G-200 层析柱。Sephadex G-200 凝胶颗粒预先在 PBS 缓冲液中溶胀过夜, 装柱 (直径 × 长 = 1.5 cm × 55 cm) 后, 用 PBS 缓冲液至少冲洗 3~4 个柱体积。上样 8 mL, 待样品进入凝胶后, 用 PBS 缓冲液开始洗脱。使用部分收集器 (BSZ-160 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂) 控制收集时间, 每 15 min 收集 1 管, 用衡流泵 (HL-2 型, 上海沪西分析仪器厂) 控制洗脱速度, 每管 2.2 mL。整个实验过程温度控制在 4℃左右。

3-羧基苯基-乙基二甲基铵 (3-carboxyphenyl ethyldimethyl ammonium, CEA) 亲和层析法: CEA 亲和柱的制备按照 Massoulie 等 (1976) 及 Xu 等 (1994) 的方法进行。按 Zhu 等 (1994) 的方法制备粗酶并纯化 AChE。取幼虫头胸部, 按 1 g:10 mL

的比例加入 PBS 缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA- Na_2 、10 mmol/L PMSF 和 0.2 mol/L NaCl), 冰浴匀浆。匀浆液用纱布过滤后, 在 4℃、105 000 × g 条件下离心 60 min, 上清液用玻璃棉过滤除去脂肪。粗酶样品上亲和柱 (直径 × 长 = 1.5 cm × 7.5 cm) 后, 先用含 0.4 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱 4~5 个柱体积, 后用含 0.2 mol/L 四乙基碘化铵的 PBS 缓冲液洗脱结合在凝胶上的 AChE, 洗脱 3 个柱体积。最后用 2 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱, 以除去残留的 AChE 和其它蛋白质, 此亲和柱可以多次使用。洗脱速度稳定为 26 mL/h, 每 6 min 收集一管, 每管收集 2.6 mL, 其它条件同凝胶过滤层析。

Procainamide 亲和层析法: Procainamide 亲和柱的制备按照 Bonning 等 (1988) 的方法进行。将 5 g ECH-Sepharose 4B 在 0.5 mol/L NaCl 中充分溶胀, 用蒸馏水冲洗。将 0.124 g EEDQ 溶解于 10 mL 的乙醇, 1.36 g Procainamide 溶解于 10 mL 蒸馏水中。将 ECH-Sepharose 4B、EEDQ 和 Procainamide 于低温下混合过夜, 然后依次用 50% 的乙醇、蒸馏水、1 mol/L NaCl 和 PBS 缓冲液冲洗。按 Zhu 等 (1992) 的方法制备 AChE 粗酶样品。样品上亲和柱后, 先用 PBS 缓冲液洗脱 3~4 个柱体积, 后用含 1 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱结合在凝胶上的 AChE。用 1 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液反复冲洗, 并用 PBS 缓冲液平衡后, 该亲和柱可多次使用。洗脱及收集过程同 CEA 亲和层析。

1.5 AChE 活性的测定

在研究 AChE 的分布时, 按 Xu 等 (1994) 的方法测定, 利用分光光度计在 412 nm 波长下测定 OD 值, 根据标准曲线求每克蛋白质每分钟水解的硫代胆碱的摩尔数; 在纯化 AChE 时, 参照 Zhu 等 (1994) 的方法测定 AChE 的活性, 用 Microplate Manager 4.0 型酶标仪在 405 nm 波长下, 采用终点法测定 OD 值, 4 次重复。

1.6 蛋白质含量的测定

用考马斯亮蓝 G_{250} 法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白 (Bradford, 1976)。

2 结果与分析

2.1 二化螟 AChE 的体躯分布

二化螟幼虫头部 AChE 的活性虽高于胸部, 但差异不显著 (表 1)。头部和胸部 AChE 的活性都极显著高于腹部 ($P < 0.01$)。表明二化螟幼虫 AChE 的活性主要集中于头部和胸部。对于成虫, 胸部

AChE 的活性最低，显著低于头部和腹部（ $P < 0.05$ ），头部和腹部之间，AChE 的活性差异不显著。从表 1 还可以看出，成虫体内 AChE 的比活力明显高于幼虫。由于用幼虫来测定二化螟的抗性，同时，幼虫容易获得，故我们以幼虫为材料分离及纯化二化螟 AChE。

表 1 二化螟 AChE 不同部位活性分布

Table 1 Distributions of AChE activity in different body parts of *C. suppressalis* [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]

体躯 Body segment	成虫 Adult	幼虫 Larvae
头 head	6.24 ± 0.12 a	2.86 ± 0.06 A
胸 thorax	4.49 ± 0.08 b	2.84 ± 0.06 A
腹 abdomen	5.66 ± 0.09 a	1.56 ± 0.03 B

平均数后字母不同，表明差异显著（小写字母， $P < 0.05$ ；大写字母， $P < 0.01$ ）

Means within columns followed by different letters are significantly different (lowercase, $P < 0.05$; capital, $P < 0.01$)

2.2 二化螟 AChE 的亚细胞分布

二化螟幼虫体内 AChE 的活力主要存在于微粒体中，其活性占总活性的 45.76%，AChE 的比活力也最高，为 $4.88 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ （表 2）。二化螟亚细胞 AChE 的总活性和比活力按大小排列依次为：微粒体 > 线粒体 > 细胞核及细胞碎片 > 胞质溶液。在整个匀浆液中，AChE 的主要活性存在于膜上，超过 86% 的活性位于有膜的亚细胞中（微粒体、线粒体、细胞核及细胞碎片）。

2.3 二化螟幼虫 AChE 的纯化

3 种方法纯化二化螟 AChE 的洗脱曲线见图 1 ~ 3。在 3 种纯化方法的洗脱曲线中，凝胶过滤层析只有一个蛋白质峰值，2 种亲和层析的蛋白质均有 2 个洗脱峰，且主峰都出现在 AChE 的洗脱峰之前，而次峰出现在 AChE 的最大峰值上。对于

表 2 二化螟 AChE 的亚细胞分布

Table 2 Distribution of AChE in subcellular fractions in *C. suppressalis*

组份 Fraction	体积 (mL) Volume	比活力 [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$] Specific activity	总活力 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) Total activity	活性百分率 (%) [*] Activity [*]
粗匀浆液 crude homogenate	22.0	0.79 ± 0.026	3.30 ± 0.11	100.0
核及细胞碎片 nuclei and cell debris	5.2	0.90 ± 0.025	0.57 ± 0.02	17.27
线粒体 mitochondria	4.0	1.57 ± 0.06	0.76 ± 0.019	23.03
微粒体 microsome	5.0	4.88 ± 0.168	1.51 ± 0.08	45.76
胞质溶液 cytosol	15.8	0.375 ± 0.009	0.45 ± 0.018	13.64

活性百分率等于各组分的总活力与粗匀浆液的总活力的比值 The percent of activity is the ratio of each subcellular fraction to crude homogenate

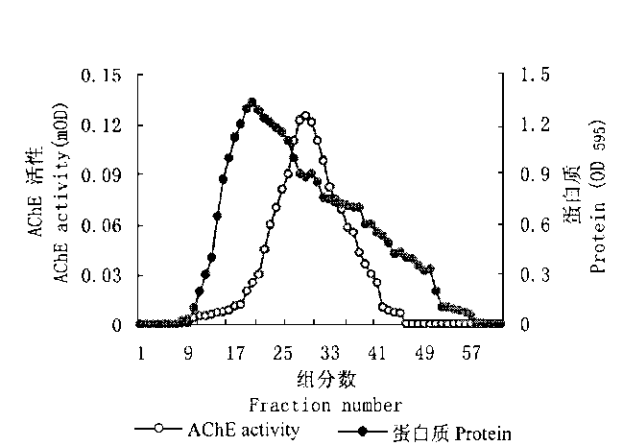


图 1 二化螟 AChE 的凝胶过滤层析

Fig. 1 Gel filtration chromatography of AChE from *C. suppressalis*

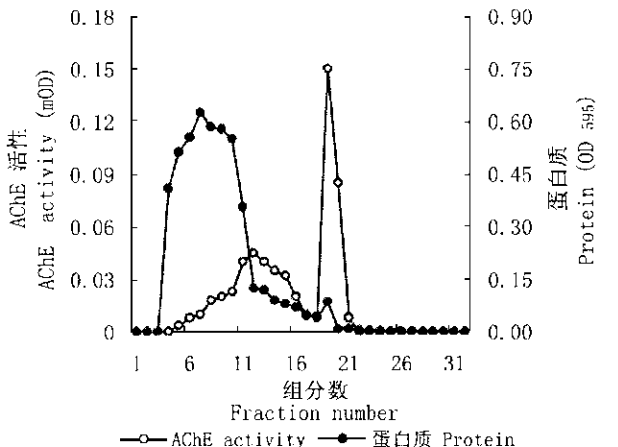


图 2 CEA 亲和层析提纯二化螟 AChE

Fig. 2 CEA affinity chromatography of AChE from *C. suppressalis*

AChE 的洗脱曲线，凝胶过滤层析只有一个洗脱峰，CEA 亲和层析有 2 个洗脱峰，次峰在前，主峰在后。次峰为没有被配体结合的 AChE，主峰为结合到亲和柱上的 AChE。CEA 亲和层析的次峰出现在用 0.4 mol/L NaCl 洗脱后的 13 组分，而结合到亲和柱上的 AChE 即主峰，被 AChE 的专一洗脱液四乙基碘化铵溶液洗脱后，出现在 19 组分，洗脱体积为 49.4 mL。在 Procainamide 亲和层析的洗脱曲线中，AChE 的次峰不明显，从组分 2 开始，到组份 17，均有相当活性的 AChE 被洗脱下来，可能由于 AChE 与配体的亲和力较弱。对于 Procainamide 亲和层析，AChE 的主峰出现在 24 组分，洗脱体积为 62.4 mL。

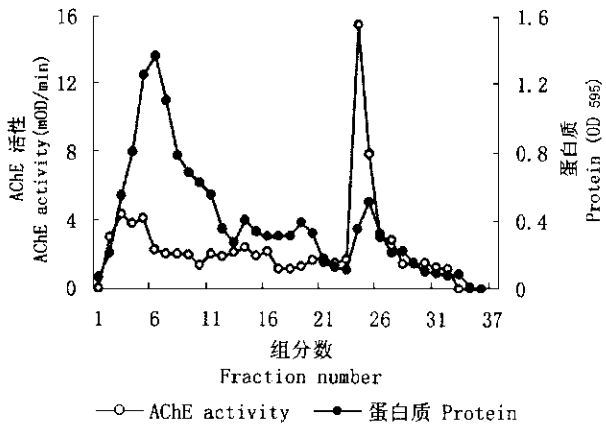


图 3 Procainamide 亲和层析提纯二化螟 AChE
Fig. 3 Procainamide affinity chromatography of AChE from *C. suppressalis*

表 3 二化螟 AChE 3 种纯化方法的比较
Table 3 Comparison of 3 purification procedures for AChE from *C. suppressalis*

过程 Procedures	体积 (mL) Volume	蛋白浓度 (mg/mL) Protein concentration	总蛋白 (mg) Total protein	比活力 [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$] Specific activity	总活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) Total activity	产率 (%) ^① Yield	纯化倍数 ^② Purification fold
粗酶样品 crude preparation of enzyme	8.0	2.19	17.52	0.59	10.33	100	1
凝胶过滤层析 gel filtration chromatography	4.4	0.10	0.44	6.05	2.66	25.75	10.25
粗酶样品 crude preparation of enzyme	64.0	1.43	91.52	0.80	73.22	100	1
CEA 亲和层析 CEA affinity chromatography	2.6	0.02	0.05	428.84	22.30	30.46	536.05
粗酶样品 crude preparation of enzyme	8.0	1.43	11.44	0.80	9.15	100	1
Procainam 亲和层析 Procainam affinity chromatography	2.6	0.006	0.017	162.74	2.73	29.83	203.43

① 产率为纯化后酶的总活性与粗酶样品总活性的比值 Yield is the ratio of purified AChE to crude preparation of enzyme; ② 纯化倍数等于纯化后酶的比活力与粗酶样品比活力的比值 Purification fold is the ratio of specific activity of purified AChE to crude preparation of enzyme

表 3 给出了 3 种纯化 AChE 方法的纯化倍数及产率等综合纯化效果。在 3 种纯化方法中，以凝胶过滤层析的纯化效果最差。其纯化倍数（纯化后 AChE 的比活力与纯化前 AChE 比活力的比值）仅为 10.25，产率 25.77%。CEA 亲和层析的纯化倍数为 536.05，产率为 30.46%，均为最高，纯化效果最好。Procainamide 亲和层析介于二者之间。

3 讨论

一些研究表明，昆虫体内 AChE 大部分位于中枢神经系统 (Fournier and Mutero, 1994)。如骚扰角蝇 *Haematobia irritans* 头部 AChE 占 85%，胸部占

12%，而腹部仅占 3% (Xu and Bull, 1994)。但也有例外的情况，如在棉铃象甲 *Anthonomus grandis* 中，55% 的活性在腹部，胸部仅占 5%，头部占 40% (Bull and Lundquist, 1968)。另外，在一些昆虫的血淋巴和胚胎中也发现了 AChE 的存在 (高希武, 1996)。本项研究表明，二化螟幼虫 AChE 的体躯分布与骚扰角蝇相似 (Xu and Bull, 1994)，AChE 活性主要分布于头、胸部，而成虫中 AChE 的体躯分布与棉铃象甲 (Bull and Lundquist, 1968) 相似，即头部和腹部中的 AChE 活性较高，胸部活性最低。可见，AChE 不仅存在于昆虫的中枢神经系统，也存在于其它的组织器官，且与神经的分布无关。二化螟幼虫 AChE 的亚细胞分布与一些昆虫

相似(高希武, 1996; Xu and Bull, 1994), AChE 的活性主要位于膜上, 且以微粒体上活性最高。

据文献报道, 已就以下昆虫的 AChE 进行了分离、纯化或者部分纯化: 家蝇 *Musca domestica* (Devonshire and Moores, 1984); 麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* (Brestkin *et al.*, 1985); 黄猩猩果蝇 *Drosophila melanogaster* (Gnagey *et al.*, 1987); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (Laster and Gilbert, 1987); 尖叶库蚊 *Culex pipiens pipiens* (Bonning *et al.*, 1988); 黄粉甲 *Tenebrio molitor* (Lenoir-Rousseaux, 1988); 美洲菸夜蛾 *Heliothis virescens* (Brown and Bryson, 1992); 豆荚草盲蝽 *Lugus Hesperus* (Zhu and Brindely, 1992); 马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu and Clark, 1994); 骚扰角蝇 (Xu and Bull, 1994); 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (高希武等, 1998)。采用的纯化方法有硫酸铵和丙酮沉淀法 (Hama *et al.*, 1980); 凝胶过滤层析法, 包括 Sephadex G-200 (高希武等, 1998; Brestkin *et al.*, 1985) 和 Sepharose 4B (高希武等, 1998) 两种方法; 凝胶过滤层析和 DEAE 离子交换层析同时使用 (Hama *et al.*, 1980) 及亲和层析法 (Zhu and Clark, 1994; Massoulie and Bon, 1976; Brestkin, *et al.*, 1985; Gnagey *et al.*, 1987)。其中, 亲和层析所使用的配体的有 3 种: Acridinium Resin (Gnagey *et al.*, 1987)、Procainamide (Brestkin, *et al.*, 1985) 和 CEA (Zhu and Clark, 1994; Massoulie and Bon, 1976)。从纯化倍数和产率等纯化效果看, 以 CEA 亲和层析法最好。目前在昆虫 AChE 的纯化上, 也以此法应用最多。Gnagey 等 (1987)、Bonning 等 (1988)、Zhu 等 (1992)、Zhu 等 (1994) 及 Xu 等 (1994) 利用亲和层析技术分别对黄猩猩果蝇、尖叶库蚊、豆荚草盲蝽、马铃薯叶甲和骚扰角蝇 AChE 的纯化倍数分别达 4 000、350、600、39 000 和 273 倍。本研究采用了三种方法纯化二化螟幼虫的 AChE, 也以 CEA 亲和层析法纯化效果最佳 (纯化倍数 536.05 倍, 产率 30.46%), 但效果远不及 Zhu 等 (1992) 对马铃薯叶甲幼虫 AChE 的纯化效果 (纯化倍数 39 000, 产率 51%)。目前, 在国内有关昆虫 AChE 纯化的报道极少, 仅高希武等 (1998) 采用凝胶过滤层析对棉铃虫的 AChE 进行过部分纯化, 而且纯化倍数极低 (最高纯化倍数仅 17.7 倍)。在昆虫的粗匀浆液中除 AChE 外, 还混有其它的蛋白质, 尤其是水解酶类对反应的结果可能会有影响。而 AChE 的纯化是对 AChE 的性质进行详细研究的基础, 是开展

昆虫毒理学和害虫抗药性, 特别是靶标抗性最基本的工作。在反应中这些蛋白质可能会降解 AChE 的抑制剂或作为结合蛋白使抑制剂有效浓度降低 (Devonshire and Moores, 1982)。因此, 在我国有必要加强对昆虫 AChE 分离和纯化的研究, 并将亲和层析特别是 CEA 亲和层析应用于昆虫 AChE 的纯化。

参 考 文 献 (References)

- Bull D L, Lundquist D A, 1968. Cholinesterase in bollweevils *Anthonomus grandis*: 1. distribution and some properties of the crude enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.*, 25: 639-645.
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brestkin A P, Maizel E B, Moralev S N, Novozhilov K V, Sazonova I N, 1985. Cholinesterases of aphids-1: isolation, partial purification and some properties of cholinesterases of spring grain aphid *Schizaphis graminum* (Rond.). *Insect Biochem.*, 15 (2): 309-314.
- Bonning B C, Malcolm C A, Hamingway J, 1988. Purification and characterization of acetylcholinesterase from *Culex pipiens pipiens* Say. *Pestic. Sci.*, 24: 278-280.
- Brown T M, Bryson P K, 1992. Selective inhibitors of methylparathion-resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 44: 155-164.
- Devonshire A L, Moores G D, 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18: 235-246.
- Devonshire A L, Moores G D, 1984. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21: 336-340.
- Fournier D, Muterio A, 1994. Mini review: modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108c (1): 19-31.
- Gnagey A L, Forte M, Rosenberry T L, 1987. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 262: 13 290-13 298.
- Gao X W, 1996. The toxicology, biochemistry and molecular biology of acetylcholinesterase. In: Leng X F, Tang Z H, Wang Y C eds. *Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance*. Beijing: China Agriculture Press. 30-33. [高希武, 1996. 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的毒理学、生物化学和分子生物学. 见: 冷欣夫, 唐振华, 王荫长. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京: 中国农业出版社. 30-33]
- Gao X W, Zhou X G, Wang R J, Zheng B Z, 1998. Distribution and purification of acetylcholinesterase in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 41 (Suppl.): 19-25. [高希武, 周序国, 王荣京, 郑炳宗, 1998. 棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的

- 体躯分布及部分纯化. 昆虫学报, 41 (增刊): 19–25]
- Gunning R V, Moores G D, Devonshire A L, 1998. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 62: 147–151.
- Hama H, Iwata T, Miyata T, Saito T, 1980. Some properties of acetylcholinesterase partially purified from susceptible and resistant green rice leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* Ulder (Hemiptera: Deltocephaliidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 15: 249–264.
- Laster D S, Gilbert L I, 1987. Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, 17: 99–109.
- Lenoir-Rousseaux J J, Arpagaus M, Toutant J P, 1988. Separation and characterization of hydrophilic and detergent interacting components of brain acetylcholinesterase from *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera). *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B: 29–35.
- Massoulie J, Bon S, 1976. Affinity chromatography of acetylcholinesterase: the importance of hydrophobic interactions. *Eur. J. Biochem.*, 68: 531–539.
- Peng Y, Chen C K, Han Z J, Wang Y C, Tian Z H, 2001. Resistance measurement of *Chilo suppressalis* from Jiangsu Province and its resistance mechanism to methamidophos. *Acta Phytophy. Sin.*, 28 (2): 172–177. [彭宇, 陈长琨, 韩召军, 王荫长, 田子华, 2001. 江苏省水稻二化螟的抗药性测定及对甲胺磷抗性机理的研究. 植物保护学报, 28 (2): 172–177]
- Shang Z Z, Wang Y S, 1984. Studies on utilization of artificial diets of the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker). *Insect Knowledge*, 21 (1): 5–9. [尚稚珍, 王银淑, 1984. 二化螟人工饲料实用化的研究. 昆虫知识, 21 (1): 5–9]
- Tang Z H, 1993. Insect Resistance to Pesticide and its Management. Beijing: China Agriculture Press. 261–296. [唐振华, 1993. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社. 261–296]
- Xu G, Bull D L, 1994. Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: Muscidae): distribution and purification. *J. Econ. Entomol.*, 87 (1): 22–26.
- Zhu K Y, Brindely W A, 1992. Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 22: 253–260.
- Zhu K Y, Clark J M, 1994. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24 (5): 453–461.
- Zhu K Y, Clark J M, 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (10): 1 129–1 138.